

# 约氏疟原虫红外期体外培养的研究

宋建勋 冯崇英 管文格 赵洪雯

(第三军医大学寄生虫学教研室 重庆 630038)

**摘要** 通过药物二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌,取肝癌白色结节用胶原酶消化,体外培养建立肝癌细胞系,筛选出对约氏疟原虫子孢子敏感的大鼠肝癌细胞系,建立了大鼠肝癌细胞——约氏疟原虫体外培养系统。约氏疟原虫子孢子接种单层培养的肝癌细胞,48h可见红外期裂殖体,72h后将培养细胞胰酶消化,消化下的细胞及培养上清一并离心,悬液接种健康小鼠,可使之感染疟疾。

**关键词** 约氏疟原虫 肝癌细胞 红外期(EEF) 体外培养

近些年来国外对疟原虫红外期(EEF)的体外培养研究的比较多,他们采用原代肝细胞<sup>[1-3]</sup>,人肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>-16 株<sup>[4]</sup>,人胚肺成纤维细胞 W<sub>138</sub> 株<sup>[5]</sup>等细胞体外培养各种哺乳类疟原虫 EEF 均获得成功;国内对人胚肺成纤维细胞<sup>[6]</sup>及鼠原代肝细胞<sup>[7]</sup>感染鼠疟原虫也相继获得成功,但由于人胚肺成纤维细胞不是疟原虫天然的靶细胞,而原代肝细胞传代又受到一定限制,亟需寻找一种适宜的宿主细胞,既是疟原虫的天然靶细胞,而又易传代,所以我们自1990年12月至1992年10月,以鼠肝癌细胞对鼠红外期体外培养进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*, Py265) 子孢子

引自军事医学科学院微生物流行病学研究所,保种于昆明株小鼠体内。每周血传一次,每五周蚊传一次,以保证其生物学特性不变。将该株鼠疟原虫接种于昆明株小鼠血传一代,饲养至第3天,薄血膜涂片检查疟原虫感染率。选择其红细胞感染率为5%—10%,其中大环状体占疟原虫比例较高的感染鼠;用斯氏按蚊吸血感染。感染蚊饲养于25±1℃,相对湿度70%—80%的恒温室内,喂以10%葡萄糖水,内含0.05%的对氨基苯甲酸(PABA)。15—17d疟原虫子孢子发育成熟后备用。

### 1.2 鼠肝癌细胞的诱发及培养

用致癌剂 DEN 定量灌喂大鼠,诱发方法参照梁晓刚<sup>[8]</sup>的方法,6个月后取肝癌白色结节用胶原酶消化分散,体外培养建立细胞系,此细胞系经传十代比较稳定后,用流式细胞仪(FCM)及HE染色常规病理切片鉴定肝癌细胞系均以肝实质细胞癌为主,其中间杂少量的胆管上皮细胞癌及成纤维细胞。共建立了13个肝癌细胞系,见表1。

表1 大鼠肝癌诱发及体外培养建系

系 别	细胞型	诱杀时大鼠 ♀♂、体重	诱发时间	分离时间
RC910A (A为1—7)	肝细胞 癌为主	♂、250 ±40g	1991.9.10 —1992.1.24	1992.3.18 —20
RC910B (B为8—13)	肝细胞 癌为主	♀、250 ±50g	1991.9.10 —1992.1.24	1992.3.22 —24

各系细胞置于37℃,相对湿度90%以上,充以5%CO<sub>2</sub>+95%空气的CO<sub>2</sub>孵箱内培养。培养液为80%RPMI 1640(GIBCO)+20%小牛血清,另外加青霉素100U/ml,链霉素100μg/ml,1mol/L HEPES 0.25ml/100ml,0.4%牛胰胰岛素0.25ml/100ml,牛白蛋白2g/L为完全培养基。

把1.8cm<sup>2</sup>的盖玻片放入直径为3.5cm的平皿和直径为3.0cm的指状管中,管高6cm,每个平皿或指状管各接种2×10<sup>6</sup>个传第12—15代的肝癌细胞于盖片中央,加入3ml RPMI 1640

完全培养基,在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养至细胞生长融合成片。24h 以后 γ 射线 (Co<sup>60</sup>) 照射 1000rad,然后换液备用。

### 1.3 疟原虫红外期体外培养

斯氏按蚊血餐感染约氏疟原虫 15—17d,选取腺感染率较高的蚊笼。从蚊笼中吸取雌蚊,先在一 20℃ 冰箱中冷麻 1min,再用乙醚麻醉,以 80% 乙醇作表面消毒,然后于无菌条件下解剖出唾液腺,收集于带培养液的载玻片上,盖玻片轻压,用结核注射器收集孢子悬液,接种于培养有肝癌细胞的培养皿和指状管内,每个接种 0.5ml,内含 6 副唾液腺,接种后立即放入 CO<sub>2</sub> 孵箱内;接种于指状管内的立即离心 1600g, 5min,然后再放入 CO<sub>2</sub> 孵箱内,2h 后用培养液冲洗,再加入 3ml 培养液,以后每天换液一次。一部分平皿和指状管 48h 后取出孔内盖片,吉氏染色,镜检;另一部分于 72h 后用胰酶消化使细胞从盖片上脱下,连同培养液一起离心 1600g,10min,其沉淀物用 1ml 培养液悬浮,腹腔注射小鼠体内,5d 后每天查血一次。检查疟原虫感染情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鼠肝癌细胞系对约氏疟原虫 By265 孢子孢子的敏感性

分离的 13 系肝癌细胞系经反复试验(不少于 10 次)仅 RC9108 系对该虫孢子敏感,平皿的红外期原虫检出率为 50% 左右,1.8cm × 1.8cm 的盖玻片上红外期裂殖体的数量在 0—3 个之间;指状管内红外期原虫检出率为 60%,但 1.8cm × 1.8cm 的盖玻片上红外期裂殖体数量也不超过 4 个。

### 2.2 在 RC9108 系肝癌细胞中 EEF 原虫的形态

在接种 48h 后吉氏染色玻片上可找到 EEF 裂殖体,裂殖体直径最大的有 37.22μm,最小的只有 22.14μm,(n = 5),原虫染色较其它细胞着色为深,而且体积较大,较易识别,但 48h 时核大多成船形,未完全分裂为单个小核,是没有完全成熟的裂殖体(见封 4)。

### 2.3 在 RC9108 系肝癌细胞中 EEF 裂殖子感染性

培养 72h 后把培养液与肝细胞腹腔接种正常昆明株小鼠体内,结果如表 2。

表 2 肝癌细胞中 EEF 裂殖子的感染性

培养方式	实验次数	接种肝癌细胞盖片数量	72h 接种鼠数	原虫血症阳性		
				5d	10d	15d
平皿	1	8	8	0	0	0
	2	8	8	0	1	1
	3	8	8	0	0	0
指状管	1	8	8	1	1	1
	2	8	8	0	1	1
	3	8	8	0	0	0

3 次实验平皿的感染率分别为 0(0/8), 12.3%(1/8), 0(0/8);指状管为 12.3%(1/8), 12.3%(1/8), 0(0/8)。把出现原虫血症的小鼠第 4d 左右(此时原虫率为 10% 左右)转种正常小鼠,3d 后血内都可出现原虫,选原虫密度在 10% 左右的小鼠感染斯氏按蚊,15d 后解剖,在唾液腺中可查见大量成熟的子孢子。

疟原孢子对侵入培养细胞的类型具有一定的选择性,这与细胞表面特异性受体有关,而其发育成熟程度则需要适宜的宿主细胞,Co<sup>60</sup> γ 射线照射(1000rad)能抑制肝癌细胞的快速生长,对原虫的侵入无影响<sup>[9]</sup>,而子孢子与培养细胞一同离心能增加培养细胞对子孢子的感染性<sup>[10]</sup>。我们培养的 13 系大鼠肝癌细胞系,只筛选出一系对鼠约氏疟原孢子敏感,而且感染率不高,这可能是与肝癌细胞的纯度、药物 DEN 的残毒对子孢子的作用、对肝细胞表面孢子受体的破坏等有关,许多问题还有待进一步研究。不论如何,我们认为大鼠肝癌细胞仍是一种研究鼠疟原虫红外期很好的宿主细胞,经过进一步的探索完善,一定能成为一种理想的实验工具,为进一步在体外研究疟原虫红外期的生物学特性,免疫学,以及各种药物和理化因素对 EEF 的影响提供实验条件。

## 参 考 文 献

- 1 Mazier D. *Nature*. 1984, **307**(26): 367—369.
- 2 Mazier D. *Science*. 1985, **227** (4685): 440—442.
- 3 Smith J. E. *Lancet*. 1984, **2**(8405): 757—758.
- 4 Hollingdal M.R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983, **32** (4): 682—684.
- 5 Hollingdal M.R. *Science*. 1981, **213**(4511): 1021—1022.
- 6 严汉英, 杨彬, 潘伟娜. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, **9** (1): 28—30.
- 7 罗树宏, 舒衡平, 刘多. 湖南医科大学学报, 1991, **16**(4): 399—402
- 8 梁晓刚, 钟光汉, 左声鹤. 第三军医大学学报, 1991, **13**(1): 32—37
- 9 Hollingdale M.R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985, **34** (1): 21—23.
- 10 Millet P. *J. Parasitol.* 1989, **75**(6): 992—994.

## IN VITRO CULTIVATION OF *PLASMODIUM YOELII* SPOROZOITES AT EXOERYTHROCYTIC STAGE FORM

SONG Jianxun FENG Chongying GUAN Wenge ZHAO Hongwen

(Department of Parasitology, The Third Military Medical College Chongqing 630038)

**ABSTRACT** Hepatic carcinomas were induced by administrating diethylnitrosamine (DEN) in rats, then white nodules in the livers of the rats were digested by collagenase type IV. 13 rat hepatoma cell lines were cultured with RPMI—1640. During the cultivation, *Plasmodium yoelii* sporozoites entered a hepatoma line, which later successfully developed into exoerythrocytic stage form (EEF). Sporozoites were added to hepatoma cells, EEF schizonts were seen 48h later, after 72h the cultured cells were digested by trypsin. Culture supernatant were collected by centrifugation and the malaria can infect healthy mice after inoculation.

**Key words** *Plasmodium yoelii* Exoerythrocytic stag form (EEF)

# 《约氏疟原虫红外期体外培养的研究》

一文之附图 (正文见第1页)

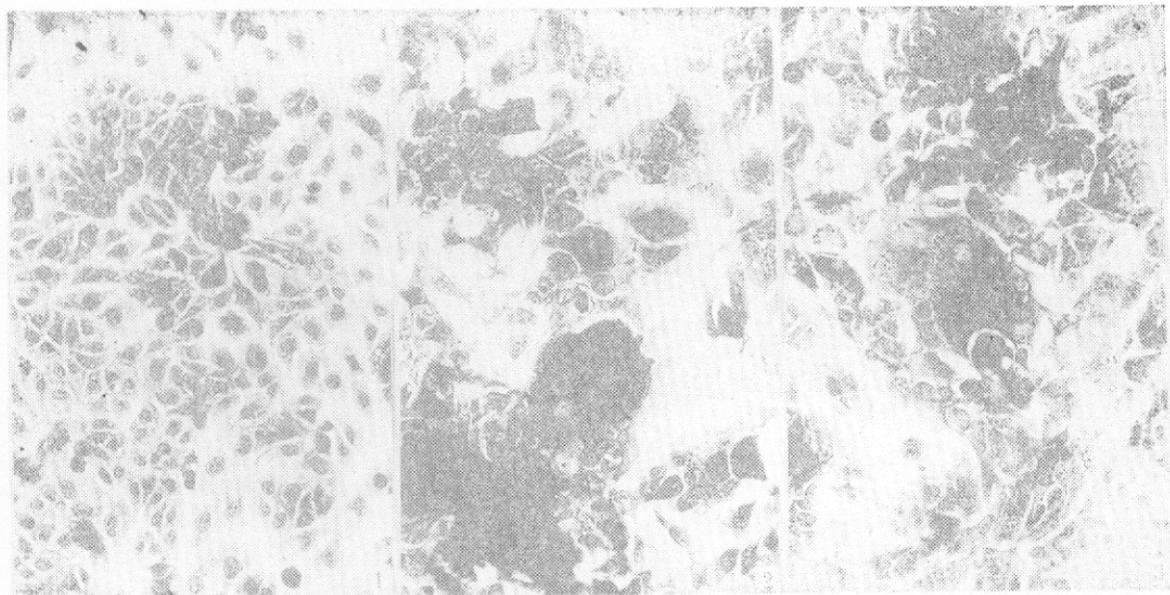


图1 体外培养的大鼠肝癌细胞系  $\times 100$ ; 图2 接种子孢子48h后,在肝癌细胞内的红外期裂殖体  $\times 200$ ; 图3 接种子孢子48h后,在肝癌细胞内的另一红外期裂殖体  $\times 200$ 。